Istituto d'igiene della R. Università di Napoli (Sezione Batteriologica)

SULL' IMPORTANZA BIOLOGICA

DELL'AGGLUTINAZIONE DEI BATTERI

Dott. NICOLA PANE

professore incaricato di batteriologia

Estratto dalla **Riforma Medica**, *N. 272, Anno XVII.*

ROMA

TIPOGRAFIA F. FAILLI

1901

Istitulo d'igiene della R. Università di Napoli (Sezione Batteriologica)

SULL' IMPORTANZA BIOLOGICA

DELL'AGGLUTINAZIONE DEI BATTERI

Dott. NICOLA PANE

professore incaricato di batteriologia

Estratto dalla **Riforma Medica**, *N. 272, Anno XVII.*

ROMA

TIPOGRAFIA F. FAILLI

1901

La parola agglutinazione per indicare il fatto dell'aggrupparsi, immobilizzandosi, dei batteri in presenza di siero di sangue in ispeciali condizioni si deve a Gruber, la cui ipotesi per ispiegare la causa di tal fenomeno rimane attualmente ancora in onore.

Come è noto, l'agglutinazione dei batteri in contatto col siero agglutinante si osserva in goccia pendente fatta con le note regole. Con un ingrandimento microscopico di circa 600 diametri al massimo, servendosi di una buona lente a secco, si osservano tutti i fenomeni in modo distinto, cioè dall'immobilizzazione dei batteri, se sono mobili, come il bacillo del tifo, all'accollarsi gli uni agli altri per formare gruppi più o meno cospicui. Se il siero è molto attivo e si mescola col brodocoltura in proporzione non molto tenue, l'agruppamento dei batteri è istantaneo e il corpo bacillare, se si tratta di bacilli, sembra rigonfiato con superficie non netta e spesso come trasformato in granuli. Se il miscuglio di siero e brodocoltura si lascia in quantità sufficiente in provette di vetro, si formano dopo un certo tempo, che può essere anche di pochi minuti, numerosissimi e fini fiocchetti, i quali cadono al fondo e il liquido diventa chiaro, trasparente. Solo eccezionalmente avendosi un'agglutinazione completa in goccia pendente il miscuglio può non chiarificarsi o chiarificarsi incompletamente. Un fenomeno non notato, che io sappia, da alcuno osservatore è un intorbidamento maggiore del brodocoltura appena vi si aggiunge il siero. Questo fenomeno, osservabile quando lo spessore del liquido è forte, ciò che si verifica nei comuni tubi di vetro da coltura, precede la comparsa dei fiocchetti.

Per osservare l'agglutinazione in vetro si può seguire un altro procedimento: s'innesta il batterio di coltura con un' ansa di platino in un miscuglio di brodo e siero agglutinante e lo si lascia sviluppare a 37° per 20 ore. Dopo questo tempo il liquido si trova trasparente e la coltura del batterio è raccolta al fondo della provetta. Quest'ultimo processo non è stato da me adoperato, ma ho impiegati i due primi, a mo' di controllo l'uno dell'altro.

I diversi lavori che si sono pubblicati dopo le ricerche di Vidal sull'agglutinazione del bacillo del tifo mediante il siero d'infermi affetti da questo morbo, lavori di cui alcuni hanno contribuito a rendere incerto quanto Vidal aveva prima stabilito, come pure l'incertezza, che si è venuta manifestando da qualche tempo intorno alla possibilità d'identificare un batterio mediante il siero agglutinante specifico, mi hanno stimolato a intraprendere da molto tempo una lunga serie di ricerche intorno a tali questioni.

I.

La preparazione del siero agglutinante, come è noto, si può ottenere con diversi metodi. Io ho preferito il seguente metodo, consigliatomi dalle mie esperienze comparative, poichè soltanto servendomi di esso ho potuto in pochi giorni ottenere un siero fortemente agglutinante. Ecco in che consiste: colture in brodo di 24 ore sviluppate a 37° vengono sterilizzate per un' ora a 60°; subito dopo la sterilizzazione vengono iniettate in conigli grandi e

forti per la via endovenosa alla dose, che corrisponde a un dipresso ai due terzi di quello che l'esperienza mi aveva dimostrato mortale pel detto animale di peso uguale. L'iniezione endovenosa viene seguita da gravi disturbi immediati (dispnea, abbattimento, talvolta sintomi di morte imminente); poi il coniglio si rileva ma per qualche giorno decresce di peso (talvolta fino a 400 grm.) Dopo 7 a 10 giorni al massimo si fa una nuova iniezione di brodocoltura frescamente sterilizzata in dose maggiore della prima. La via scelta questa seconda volta era il peritoneo, attesa la difficoltà dell'iniezione endovenosa, perchè il lume delle vene auricolari in seguito alle prime iniezioni era quasi scomparso. Alcuni giorni dopo questa seconda iniezione, in ogni caso, quando l'animale aveva raggiunto quasi il peso primitivo, veniva svenato col taglio della carotide e il sangue raccolto a traverso un tubo di gomma, asetticamente, in bottiglia di vetro. Il siero ricavatone, limpido, completamente privo di germi, serviva per le diverse prove d'agglutinazione nel modo avanti indicato. L'esame della goccia pendente veniva fatto immediatamente dopo la preparazione e poi ripetuto dopo 20 a 40 minuti e dopo 2 ore. L'esame comparativo della reazione agglutinante, cioè formazione di fiocchetti e chiarificazione, *in vitro*, veniva prolungato fino a 4 ore e poi di nuovo dopo 24 ore.

Quando è stato necessario fare ricerche di precisione, come quelle riportate nell'annessa tabella, al coniglio una quindicina di giorni prima d'iniettargli il brodocoltura si sottraevano circa 15 cc. di sangue mediante il taglio di una carotide, che poi veniva subito legata e la ferita chiusa. La guarigione avveniva rapidamente e il coniglio sopportava le iniezioni di brodocoltura sterilizzato così bene come il coniglio nuovo.

In tal modo si facevano ricerche comparative sulle agglutinazioni del siero dello stesso animale prima e dopo l'iniezione di batteri e loro prodotti solubili, come si può rilevare nella annessa tabella.

Tra i batteri adoperati è degno di nota specialmente il colisimile (v. tabella). Questo batterio proviene da un infermo morto nel 1898 nella 1ª Clinica medica diretta dal prof. De Renzi e da me studiato. Si trattava di un uomo affetto da tubercolosi cronica, che aveva contemporaneamente avuto un ascesso alla parete toracica, dopo di che i fatti polmonari si aggravarono, l'espettorazione crebbe enormemente. In queste condizioni entrato in Clinica morì dopo pochi giorni. L'esame batterioscopico e quello batteriologico dimostrarono la presenza quasi in coltura pura del suddetto bacillo. Alla sezione si trovarono oltre i segni di tubercolosi diffusa, estesa cangrena polmonare, specialmente delle pareti delle grosse caverne e grande raccolta di pus in un cavo pleurico. Il pus, di cattivo odore, presentava enorme numero dello stesso bacillo. Questo fu da me identificato per un colisimile, poichè, salvo l'assenza della reazione nitrosa dell'indolo e una maggiore mobilità in goccia pendente, per gli altri caratteri rassomigliava al coli. Importante è il fatto che dopo tre anni di vita saprofitica i bacilli conservano la forma regolare, breve e giammai formano dei lunghi filamenti come il coli vero. Esso è fortemente patogeno per le cavie e pei conigli, che soccombono financo con una dose di cc. 0,0001 per inoculazione endovenosa. Come si rileva dalla tabella, questo batterio è sensibile all'agglutinazione a contatto col siero agglutinante specificamente il bacillo del tifo, e viceversa, questo è anche più sensibile all'agglutinazione col siero agglutinante il primo specificamente. Gli altri batteri adoperati, figuranti nell'annessa tabella, sono: il bacillo del tifo di cinque provenienze diverse (a, b, n, p, r) di cui una (a) è rappresentata dal bacillo isolato da me dalla milza d'un tifoso, dotato di discreta virulenza per la cavia e pel coniglio e che ho adoperato per ottenere il siero agglutinante nel modo suddetto; inoltre il bacterium coli di tre provenienze diverse, una (b) dalle feci diarroiche d'un infermo febbricitante e gli altri due provenienti da feci di due individui diversi: tutti e tre somiglianti per forma, mobilità (scarsa) e gli altri caratteri comuni del coli. Il coli β è stato il solo adoperato per ottenere il siero agglutinante. Agli anzidetti batteri ne ho aggiunti tre altri non aventi con essi alcuna somiglianza, cioè uno streptococco virulento e uno pneumococco di due diverse provenienze, virulentissimi pel coniglio.

Le conclusioni che si possono dedurre da queste ricerche sono le seguenti:

1.° Il bacillo del tifo delle comuni collezioni, qualunque ne sia la provenienza, viene agglutinato in egual grado dal siero agglutinante specifico ottenuto da un animale coll'i-

niezione di bacilli (sterilizzati) appartenenti a una sola provenienza.

2.° Il bacillo del tifo, quantunque in grado relativamente piccolo e ineguale, può essere anche agglutinato da sieri agglutinanti specificamente batteri di specie diversa. Il grado dell'agglutinazione può raggiungere quello ritenuto attualmente in clinica come atto a far stabilire con certezza la diagnosi di tifo (1:50) ed eccezionalmente anche superarlo (1: 100).

3.° Salvo eccezioni, vi ha maggiore affinità in rapporto all'agglutinazione tra il bacillo del tifo e batteri di specie diversa (ad es: il bacillo coli), che tra batteri di diversa provenienza appartenenti a una stessa specie (bacterium coli, pneumococco).

4.° Fatta eccezione pel bacillo del tifo quando si adopera un siero di fortissimo potere agglutinante specifico, la agglutinazione come mezzo diagnostico di batteri appartenenti a una stessa specie dà risultati affatto incerti.

II.

Questi dati, che si rilevano da quanto è risultato dalle mie ricerche, sono stati in parte rilevati anche da altri osservatori precedententemente. È noto che Vidal, il quale ebbe il merito di iniziare le ricerche di agglutinazione sul bacillo del tifo, non col siero di sangue di animali immunizzati contro questo batterio, ma col siero di sangue di tifosi, stabilì che questo siero, ottenuto a cominciare dalla fine della prima settimana di malattia o dal principio della seconda, agglutina sicuramente il bacillo del tifo nella proporzione di 1:10 (una parte di siero e 10 parti di brodocoltura) e che ciò costituisce un mezzo sicuro per ammettere o negare la diagnosi del tifo. Ora Sternberg, pochi mesi dopo le prime conclusioni di Vidal, trovò che un'agglutinazione anche maggiore di 1:10 si può ottenere col siero di persone non affette da tifo. Egli col siero di persona sana ebbe agglutinazione del bacillo del tifo a 1:30 (1). Queste osservazioni, confermate anche ed ampliate da altri autori (Sklover, Förster, Biberstein ecc.), resero necessaria un'agglutinazione mediante il siero di sangue dei tifosi in proporzione molto maggiore che a 1:10 per accertare la diagnosi. Attualmente si ritiene che a questo scopo possa bastare la reazione agglutinante a 1:50 perchè si possa stabilire con sicurezza la diagnosi di tifo. Giova però notare che anche a 1:50 si è osservato eccezionalmente in siero non appartenente a tifosi, o guariti di tifo, agglutinazione a 1:50. Ad esempio Köhler trovò questa proporzione nel siero di sangue di un uomo anemico (2). D'altra parte si è veduto sperimentalmente che questa agglutinazione del bacillo del tifo relativamente forte può essere la somma del potere agglutinante normale del siero ed una piccola parte di quella che acquista in seguito all'inoculazione nell'organismo di un qualunque batterio (vedi la tabella annessa). Si ha allora che mentre il siero agglutina questo batterio in proporzione più o meno molto alta (agglutinazione specifica), agglutina invece il bacillo del tifo al massimo alcune volte più di quello che agglutinava prima che all'animale s'inoculassero batterî. Questo fatto, che in seguito alle mie ricerche si può ritenere generale, era stato indicato da altri osservatori (Iatta, Sternberg) relativamente al coli e colisimile.

Non meno degno di nota è il fatto opposto, che si osserva nel siero agglutinante specificamente il bacillo del tifo, l'agglutinazione, cioè, in grado elevato, che questo siero può esercitare su certi speciali batterî appartenenti d'ordinario al gruppo del b. coli e colisimile. Che io sappia, fu Beco (3) il primo che osservò l'agglutinazione in grado molto elevato (1:10,000) di tre provenienze diverse del b. coli e di un bacillo fluorescente mediante il suo siero antitifico. Sternberg (4) con un siero che agglutinava il bacillo del tifo a 1:5000 osservò agglutinazione a 1:1000 di 4 colisimili (egli li chiama paracoli) di cui ciascuno proveniva da acqua sospettata di essere veicolo di propagazione del tifo. Con siero appartenente ad infermi di tifo Iatta (5) e Sacquépée (6) hanno osservato agglutinazione del b. coli di diverse provenienze a 1 : 100, mentre lo stesso batterio di diverse altre provenienze a 1/10 non presentava agglutinazione. Come si rileva dall'annessa ta-

(1) Stern. Centralbl. f. inn. Medicin, 1896.

(2) Köhler. Centralblatt f. Bakteriologie ecc. 1901, Bd. 29.

(3) Beco. Bulletin de l'Academie de Médecine de Belgique, 1898.

(4) Sternberg. Zeitscrift f. Hygiene, u. Inf. Bd. 34, 1900.

(5) Iatta. Zeitschrift f. Hygiene, u. Inf. Bd. 33, 1900.

(6) Sacquépée. La Presse médicale, num. 46, 1901.

bella con siero agglutinante molto energicamente (1:50,000) il bacillo del tifo, la massima agglutinazione è stata soltanto a 1:30 in un colisimile.

Quale è dunque la causa perchè due specie diverse di batterii possono essere agglutinate dallo stesso siero sia pure in grado molto disuguale? Noi non possiamo affatto da ciò argomentare che si tratti di specie affini, perchè ad esempio, nulla vi potrà essere biologicamente di affine tra i caratteri dello streptococco, o dello pneumococco, e quelli del bacillo del tifo. D'altra parte abbiamo batterii di provenienza diversa, che costituiscono un'unica specie, o tutto al più diverse razze di questa, e tuttavia possono agglutinare collo stesso siero, proveniente da un animale immunizzato contro una razza, in grado molto diverso, o non agglutinare affatto, o quasi, ad eccezione della razza contro cui è stato immunizzato l'animale. Un esempio classico confermante nel modo più evidente quest'ultimo fatto ce l'offre lo pneumococco (7). Prendendo il siero antipneumococcico, o antipneumonico, che dir si voglia, di alto potere immunizzante, che io da molti anni preparo, e saggiandone il potere agglutinante con pneumococchi di diversa provenienza, si trova che raramente viene agglutinato uno pneumococco diverso da quello adoperato per immunizzare gli animali (asini, conigli) e quando è agglutinato, è sempre in proporzione molto inferiore a quella a cui è agglutinato quest'ultimo. Tuttavia, qualunque sia la provenienza dello pneumococco, la sua azione patogena può essere annullata dallo stesso siero, come risulta dalle ricerche mie, di Foà, Cacciopppo, Banti, Eyre e Washbourn, Deutsch, ecc. Anche il siero specifico agglutinante lo spirillo del colera asiatico in alto grado dimostra scarso o nessuno potere agglutinante verso spirilli colerici di date provenienze, ad esempio il noto spirillo del colera di Massouah, il bacillo del colera delle Indie in presenza del siero di animali immunizzati con spirilli del colera di Parigi. (Vidal e Nobécourt).

Da tutto quello che son venuto esponendo mi sembra risulti molto chiaro che l'assenza o la deficienza dell'agglutinazione di un batterio rispetto ad un altro, che abbia caratteri simili, non basta a farne escludere l'identità. Certo se l'agglutinazione di due batterii di diversa provenienza, apparentemente simili, vengono agglutinati in egual modo dal siero agglutinante specifico di uno di essi, non v'ha dubbio che ciò costituisce la prova decisiva della loro identità. Tale è il caso come abbiamo veduto del bacillo del tifo di diversa provenienza (8).

Nelle scienze sperimentali le ipotesi hanno valore soltanto se esse danno una spiegazione il più che possibile logica di certi fenomeni concomitanti. Ora vediamo se nelle ipotesi emesse intorno alla causa dell'agglutinazione dai diversi autori (Gruber, Nicolle, Dineur, Paltauf, Bordet), vi sia nulla che possa in qualche modo spiegare perchè di due batterii di diversa provenienza, ma appartenenti alla stessa specie, uno può non essere agglutinato dal siero, che agglutina l'altro specificamente.

---

(7) Bezançon e Griffon. (Annales de l'Institut Pasteur, 1901), hanno fatto ricerche sull'agglutinazione dello pneumococco mediante il siero di sangue di polmonitici e di conigli immunizzati contro questo batterio, adoperando il metodo delle colture in siero e brodo, metodo che anch'io usai per lo stesso microbo alcuni anni fa (Riforma Medica e Centralblatt für Bakteriologie, 1897). E' però un errore l'asserzione degli autori che l'agglutinazione della coltura in brodo dello pneumococco non si verifica aggiungendovi del siero agglutinante in date proporzioni. In questa reazione in vitro si ha un fenomeno curioso ed apparentemente inesplicabile, sul quale forse ritornerò con una breve nota tra non molto. Esso consiste in questo: che la diluizione massima del siero capace di agglutinare lo pneumococco chiarifica anche abbastanza presto il brodocoltura, mentre la diluizione concentrata non lo chiarifica. Ad esempio, un siero che agglutina a 1:100 e chiarifica il brodocultura in un'ora, a 1:1 non lo chiarifica neanche dopo un giorno e agglutina i batterii parzialmente.

(8) Non è da tacere che alcuni autori hanno rilevato differenze considerevoli nel grado d'agglutinazione di bacilli del tifo di diversa provenienza. È probabile che ciò sia dipeso da modificazioni temporanee avvenute in rapporto alla loro sensibilità all'azione del siero agglutinante. Certa cosa è, d'altra parte, che altri, me compreso, i quali hanno esaminato il potere di agglutinabilità di numerosi bacilli del tifo di diversa provenienza, ritirati per lo più dalle collezioni batteriche conservate in diversi laboratorii, hanno trovato identità completa o quasi nel grado di agglutinazione. (Vidal e Sicard, Van de Welde, Iatta, ecc.).

Nell'ipotesi di Gruber, la più antica in ordine cronologico, si ritiene come probabile che la sostanza agglutinante del siero, l'agglutinina, a contatto dei batteri rende insolubili certe sostanze della loro membrana, la quale in conseguenza diventa rugosa e vischiosa, donde segue che i batterii venendo a contatto tra loro sia per movimento attivo, sia per movimento passivo dovuto al liquido che li tiene sospesi, aderiscono tra loro in gruppi più o meno cospicui. Il Gruber, come si disse in principio, chiamò questo fenomeno agglutinazione e bisogna confessare che i fenomeni che si osservano in goccia pendente durante l'agglutinazione sono spiegati dalla sua ipotesi con alquanta esattezza, fatta astrazione dalle serie obbiezioni di Bordet, il quale fa rilevare, tra l'altro, che l'alterazione del contorno dei batterii, i quali possono risolversi anche in granuli, non ha luogo se il siero viene previamente riscaldato per mezz'ora a 55°.

Salvo quella di Bordet, le altre ipotesi poggiano tutte, come quella di Gruber, sulla supposizione che il siero agglutinante agisca mediante una sostanza chimica; ma, secondo me, esse non contengono nulla di speciale, se ne togli l'idea di Paltauf, che l'agglutinazione possa essere un fenomeno di coagulazione (idea non accettata da alcuno), che le possa far preferire alle ipotesi di Gruber-Bordet, al contrario, crede possibile che si possano spiegare tutti i fenomeni dell'agglutinazione con la perdita di equilibrio dei batterii sospesi nel liquido agglutinante. Perduto l'equilibrio, i batterii s'attrarrebbero scambievolmente e così si formerebbero raggruppamenti più o meno cospicui di essi allo stesso modo come avviene l'aggruppamento delle molecole di caseina del latte sotto l'influenza del caglio (Duclaux). In appoggio della sua ipotesi Bordet porta il fatto che l'argilla in emulsione omogenea in acqua distillata precipita tosto che si aggiunge al liquido del cloruro di sodio in quantità di 0,70 %. Ipotesi per ipotesi, a me sembra che questa di Bordet contenga qualche cosa che vale a spiegare il fatto per cui sono entrato nell' esame di questa ipotesi. Non è improbabile infatti che un batterio per ispeciale resistenza acquistata nell'ambiente, dove si trova, resista all'influenza del siero agglutinante specifico proveniente da animale immunizzato con batterio identico, ma che ha vissuto in ambiente diverso.

Batteri adoperati	Reazione in goccia pendente (g. p.) e in vitro (i. v).	Siero coniglio normale	Siero coniglio qui acanto imm. pel tifo a.	Siero coniglio normale	Siero coniglio qu acanto imm pel tifo a.	Siero coniglio normale	Siero coniglio qui acanto imm. pel colis. α	Siero coniglio normale	Siero coniglio qui acanto imm. pel colis. α	Siero coniglio normale	Siero coniglio qui acanto imm. pel coli. β.	Siero coniglio normale	Siero coniglio qui acc. imm. contro lo streptoc.	Siero coniglio normale	Siero coniglio qui acc. imm. contro lo pneuom. I
Tifo a	g. p.	1:5	1:50,000	1:10	1:10,000	1:10	1:30	1:5	1:50	1:5	1:10	1:5	1:30	1:5	1:30
»	i. v.	1:5*	1:50,000	1:10*	1:10,000	1:10*	1:30*	1:5*	1:50*	1:5*	1:10*	1:5	1:30*	1:5	1:30
Tifo b.	g. p.	1:1	1:50,000	1:5	1:10,000	1:10	1:20	1:5	1:30	1:5	1:10*	1:5	1:30	1:5	1:30
»	i. v.	1:1*	1:50,000	1:5*	1:10,000	1:10*	1:20*	1:5*	1:50*	1:5*	1:10	1:5	1:30*	1:5	1:30
Tifo n.	g. p.	1:5	1:50,000	1:5	1:10,000	1:10	1:20	1:5	1:50	1:5	1:20	1:5	1:30	1:5	1:30
»	i. v.	1:5*	1:50,000	1:5*	1:10,000	1:10*	1:20*	1:5*	1:50*	1:5*	1:30*	1:5	1:30*	1:5	1:30
Tifo p.	g. p.	1:5	1:50,000	1:10	1:10,000	1:10	1:30	1:5	1:100	1:5	1:20	1:5	1:30	1:5	1:30
»	i. v.	1:5*	1:50,000	1:10*	1:10,000	1:10*	1:30*	1:5*	1:50*	1:5*	1:30*	1:5	1:30*	1:5	1:30
Tifo r.	g. p.	1:5	1:50,000	1:5	1:10,000	1:10	20	1:5	1:50	1:5	1:10	1:5	1:30	1:5	1:30
»	i. v.	1:5*	1:50,000	0	1:10,000	1:10*	20*	1:5*	1:50*	1:5*	1:10*	1:5	1:30*	1:5	1:30
Colisimili C. α.	g. p.	1:10	1:30	1:1	1:30	1:5	1:1,000	1:1	1:5,000	0	0	0	0	0	0
»	i. v.	0	1:10*	0	1:10*	0	1:1,000	0	1:5,000	0	0	0		0	0
Coli. C. β.	g. p.	1:5	1:20	1: 1	1:10	1:1	1:1	1:1	1:1	1:5	1:1000	1:1	0	0	0
»	i. v.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:1000	0	0	0	0
C. γ.	g. p.	0	0	0	0	0	1:1	0	1:1	0	0	0	0	0	0
»	i. v.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:1*	0	0	0	0
C. δ.	g. p.	0	1:1	1:1	1:10	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:10	0	0	0	0
»	i. v.	0	0	0	1:5*	0	0	0	0	0	1:10*	0	0	0	0
Streptococco	g. p.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:30	0	0
»	i. v.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:30*	0	0
Pneumococ. I.	g. p.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:100
»	i. v.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:100
Pneumococ. II.	g. p.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:1
»	i. v.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N. B. 0 indica che a 1:1 non si è avuta agglutinazione affatto o si è avuta solo incompleta. Le cifre da 1:1 a 1:50,000 indicano il rapporto tra brodocoltura e siero in cui si è verificata al massimo l'agglutinazione. Il segno * indica che la chiarificazione completa del liquido è stata osservata dopo 24 ore.